

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭61-252215

⑤Int.Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ④公開 昭和61年(1986)11月10日  
 C 08 F 291/00 MP Z A-6681-4J  
 C 07 K 17/08 8318-4H  
 C 08 F 8/00 MF V A-7167-4J ※審査請求 未請求 発明の数 3 (全22頁)

④発明の名称 アミノ基を有する分子の固定化用物質、その製造方法およびその使用方法

②特 願 昭60-97675

②出 願 昭60(1985)5月7日

優先権主張 ③1984年5月7日③カナダ(CA)④453747

⑦発 明 者 アルフレッド・ボラツ カナダ国、エム・6・ビー、4・ジー・6、オンタリオ、トロント、アパートメント1400、マーレ・アベニュー、135

⑧出 願 人 エイチ・エス・シー・カナダ国、エム・5・ジー、1・エックス・8 オンタリオ  
 リサーチ・デイベロツ オ・トロント、ユニバーシティ・アベニュー、555  
 プメント・コーポレイ  
 ション

④代 理 人 弁理士 柳川 泰男  
 最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

アミノ基を有する分子の固定化用物質、  
 その製造方法およびその使用方法

## 2. 特許請求の範囲

1. 有効なアミノ基を含む分子の固定化において使用する表面処理を施した重合物質であって、上記物質はこれに結合する少なくとも一つのポリマーを有し、上記ポリマーは少なくとも二つのモノマーの混合物より生成され、上記モノマーのうちの一つは上記固定化される分子中のアミノ基に結合するために有効な活性基を含み、そして多数の上記活性基が上記物質との間に間隔を置いて上記ポリマー上に分散していることを特徴とする重合物質。

2. 上記重合物質が、さらに有効なアミノ基を含む複数の分子を含有し、そして上記複数の分子はそれぞれ上記ポリマー上に分散している上記活性基の一つに上記アミノ基によって共有結合していることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載

の表面処理を施した重合物質。

3. 有効なアミノ基を含む分子の固定化において使用する表面処理を施した重合物質であって、上記物質はこれに結合する少なくとも一つのポリマーを有し、上記ポリマーは下記一般式(I)によって表されるモノマー及び下記一般式(III)によって表されるモノマーの混合物より生成されることを特徴とする表面処理を施した重合物質。

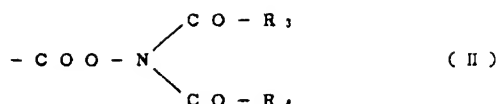


[一般式(I)において、

R<sub>1</sub>は、水素原子、メチル基、または炭素原子数16以下の脂肪族あるいは芳香族よりなる基であり；

Zは、下記一般式(II)によって表される基であり；そして、

Wは、炭素原子数16以下の脂肪族、芳香族あるいは脂肪族と芳香族よりなる基、または、原子数16以下の脂肪族、芳香族あるいは脂肪族と芳香族よりなる基である]



[一般式(II)において、

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、互いに結合していても結合していなくてもよく、水素原子、炭素原子数16以下の脂肪族、芳香族あるいは脂肪族と芳香族よりなる基、または複素原子として酸素原子、窒素原子、硫黄原子、フッ素原子、臭素原子および/または塩素原子を有しかつ炭素原子数16以下の脂肪族、芳香族あるいは脂肪族と芳香族よりなる基であって、R<sub>3</sub> と R<sub>4</sub> が結合している場合には、両者が単一の芳香族よりなる基を形成してもよい]



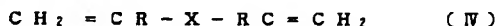
[一般式(III)において、

R<sub>2</sub> は、水素原子、メチル基、または炭素原子数16以下の脂肪族あるいは芳香族よりなる基であり；そして、

Y は、炭素原子数16以下の脂肪族、芳香

6. 上記一般式(III)において、Yが水酸基、アミドおよびカルボキシ基からなる群より選ばれる一種類の基を含む親水性基を含有することを特徴とする特許請求の範囲第3項または第4項記載の表面処理を施した重合物質。

7. 上記ポリマーが、さらに下記一般式(IV)によって表わされるモノマーを含有することを特徴とする特許請求の範囲第3項記載の表面処理を施した重合物質。



[一般式(IV)において、

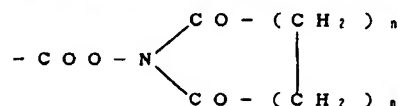
R は、水素原子、メチル基、または炭素原子数16以下の脂肪族あるいは芳香族よりなる基であり；そして、

X は、炭素原子数16以下の脂肪族、芳香族あるいは脂肪族と芳香族よりなる基または複素原子として酸素原子、窒素原子あるいは硫黄原子を有しかつ炭素原子数16以下の脂肪族と芳香族よりなる基である]

8. 上記ポリマーが、さらに下記一般式(V)

族あるいは脂肪族と芳香族よりなる基または複素原子として酸素原子、窒素原子および硫黄原子を有しかつ炭素原子数16以下の脂肪族、芳香族あるいは脂肪族と芳香族よりなる基である]

4. 上記一般式(I)乃至(III)において、Zが下記一般式によって表わされる基であり、Yが炭素原子数1乃至6である脂肪族よりなる基であり、そしてR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、XおよびWが炭素原子数1乃至6を含むことを特徴とする特許請求の範囲第3項記載の表面処理を施した重合物質。

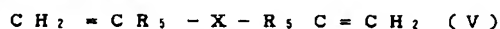


[上記一般式において、

n は1、2または3である]

5. 上記一般式(III)において、Yが親水性基を含有することを特徴とする特許請求の範囲第3項または第4項記載の表面処理を施した重合物質。

によって表わされるモノマーを含有することを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の表面処理を施した重合物質。



[一般式(V)において、

R<sub>3</sub> は、水素原子、メチル基、または炭素原子数16以下の脂肪族あるいは芳香族よりなる基であり；そして、

X は、炭素原子数1乃至6である脂肪族、芳香族あるいは脂肪族と芳香族よりなる基または複素原子として酸素原子、窒素原子あるいは硫黄原子を有しかつ炭素原子数1乃至6である脂肪族と芳香族よりなる基である]

9. 上記重合物質が、さらに活性アミノ基を含む複数の分子を含有し、そして上記複数の分子はそれぞれ上記ポリマー上に分散している上記Z基の一つに上記アミノ基によって共有結合していることを特徴とする特許請求の範囲第3項、第4項または第7項記載の表面処理を施した重合物質。

10. 上記重合物質が、さらに複数の抗体また

は抗原分子を含有し、そして上記複数の分子はそれぞれ上記ポリマー上に分散している上記Z基の一つにそれぞれのアミノ基によって共有結合していることを特徴とする特許請求の範囲第3項、第4項または第7項記載の表面処理を施した重合物質。

11. 上記重合物質が、さらにポリペプチドおよび多糖類からなる群より選ばれる一種類の分子を複数含有し、そして上記複数の分子はそれぞれ上記ポリマー上に分散している上記Z基の一つにそれぞれのアミノ基によって共有結合していることを特徴とする特許請求の範囲第3項、第4項または第7項記載の表面処理を施した重合物質。

12. 上記重合物質が、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネートおよびポリアクリレートからなる群より選ばれる一種類の物質を含むことを特徴とする特許請求の範囲第3項、第4項または第7項記載の表面処理を施した重合物質。

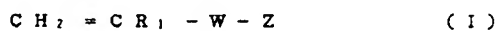
13. 上記モノマーを、不活性な気体中および

なる溶液中に溶解し、不活性な気体中、上記重合物質の存在下および40℃から上記溶媒の沸点の範囲内の温度で、フリー・ラジカルを生じる化合物（上記範囲内の温度で分解してフリー・ラジカル化合物を生成する）と処理し；そして、

(ii) 上記重合物質を脱イオン水で洗浄することによって、

上記複数のポリマーを形成して上記重合物質に結合させることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載の表面処理を施した重合物質の製造方法。

15. 下記一般式(I)によって表されるモノマーおよび下記一般式(III)によって表されるモノマーを、



[一般式(I)において、

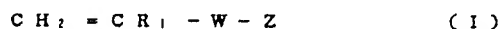
R<sub>1</sub>、WおよびZは特許請求の範囲第3項において定義した通りである]



[一般式(III)において、

上記モノマーに対して不活性な溶媒の存在下で、フリー・ラジカルを生じる化合物（化学的および光化学的のうちいずれかの作用により分解して、グラフト重合を開始させるフリー・ラジカル化合物を生成する）と反応させることによってグラフト重合させて上記重合物質を得ることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の表面処理を施した重合物質の製造方法。

14. 下記一般式(I)によって表されるモノマーおよび下記一般式(III)によって表されるモノマーを、



[一般式(I)において、

R<sub>1</sub>、WおよびZは特許請求の範囲第3項において定義した通りである]



[一般式(III)において、

R<sub>2</sub>およびYは特許請求の範囲第3項において定義した通りである]

(i) 上記モノマーに対して不活性な溶媒から

R<sub>2</sub>およびYは特許請求の範囲第3項において定義した通りである]

(i) 上記モノマーに対して不活性な溶媒（光反応性のフリー・ラジカルを生じる化合物を含む）からなる溶液中に溶解し、不活性な気体中、上記重合物質の存在下および0℃から上記溶媒の沸点の範囲内の温度で放射処理（上記フリー・ラジカルを生じる化合物からのフリー・ラジカル化合物の生成を促進する）し；そして、

(ii) 上記重合物質を脱イオン水で洗浄することによって、

上記複数のポリマーを形成して上記重合物質に結合させることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載の表面処理を施した重合物質の製造方法。

16. 上記の(i)および(ii)の工程に加えて、

(iii) 上記重合物質を乾燥する、

工程を含むことを特徴とする特許請求の範囲第14項または第15項記載の製造方法。

17. 上記溶媒がアルコール、エーテル、エステルおよびケトンからなる群より選ばれる一種類の物質を含み、上記フリー・ラジカルを生じる化合物がアゾ化合物、有機過酸化物および過酸エステルからなる群より選ばれる一種類または二種類以上の物質を含み、そして上記不活性な気体が窒素およびアルゴンからなる群より選ばれる一種類の気体を含むことを特徴とする特許請求の範囲第14項記載の製造方法。

18. 上記溶媒がアルコール、エーテル、エステルおよびケトンからなる群より選ばれる一種類の物質を含み、上記フリー・ラジカルを生じる化合物が芳香族ケトンを含み、そして上記不活性な気体が窒素およびアルゴンからなる群より選ばれる一種類の気体を含むことを特徴とする特許請求の範囲第15項記載の製造方法。

19. 上記フリー・ラジカルを生じる化合物がベンゾフェノンからなることを特徴とする特許請求の範囲第15項記載の製造方法。

20. 上記(i)の工程における反応時間が2

(iii)上記表面処理を施した重合物質を水性かつ非求核性の緩衝溶液中、pH7.5から8.5の範囲内、0℃から37℃の範囲内の温度、および加水分解試薬の存在下で、それぞれ有効なアミノ基を有する複数の分子と処理することで、上記分子をそれぞれ上記ポリマー上に分散している上記活性Z基の一つに上記アミノ基によって共有結合させる、

工程を含むことを特徴とする特許請求の範囲第15項記載の製造方法。

24. 上記加水分解試薬が、ウシ血清アルブミン、卵アルブミン、非イオン性界面活性剤およびこれらの混合物からなる群より選ばれる物質を含むことを特徴とする特許請求の範囲第22項または第23項記載の製造方法。

25. 上記有効なアミノ基を有する分子が抗体または抗原を含むことを特徴とする特許請求の範囲第22項または第23項記載の製造方法。

26. 免疫検定法の処理方法において、特許請求の範囲第1項、第3項または第4項記載の表面

乃至10時間であることを特徴とする特許請求の範囲第14項または第17項記載の製造方法。

21. 上記(i)の工程における反応時間が10分乃至2時間であることを特徴とする特許請求の範囲第15項、第18項または第19項記載の製造方法。

22. 上記の(i)および(ii)の工程に加えて、

(iii)上記表面処理を施した重合物質を水性かつ非求核性の緩衝溶液中、pH7.5から8.5の範囲内、0℃から37℃の範囲内の温度、および加水分解試薬の存在下で、それぞれ有効なアミノ基を有する複数の分子と処理することで、上記分子をそれぞれ上記ポリマー上に分散している上記活性Z基の一つに上記アミノ基によって共有結合させる、

工程を含むことを特徴とする特許請求の範囲第14項記載の製造方法。

23. 上記の(i)および(ii)の工程に加えて、

処理を施した重合物質を用いて、抗原または抗体のアミノ基を上記重合物質が有するポリマーに結合させることにより、上記抗原または抗体を、上記重合物質と間に間隔を置いた関係となるように固定化する方法。

27. 有効なアミノ基を有する分子を固定化する処理方法において、特許請求の範囲第1項、第3項または第4項記載の表面処理を施した重合物質を用いて、上記分子のアミノ基を上記重合物質が有するポリマーに結合させることにより、上記分子を、上記重合物質と間に間隔を置いた関係となるように固定化する方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### [発明の分野]

本発明は、有効なアミノ基を含む分子の共有結合性固定化における新規な器具および新規な技術に関するものである。詳しくは本発明は、血清のような体液中に低濃度で存在する蛋白質の検出、および定量に適用される。さらに詳しくは本発明は、免疫検定法(Immunoassay)の技術を用いる

抗原性物質の定量に利用することができる抗体および抗原の固定化に適用される。

#### 〔発明の背景〕

血清または他の体液中に低濃度で存在する抗原性物質の存在または濃度を決定するには、免疫検定法の技術を利用する場合が多くなっている。上記技術は、抗体が対応する抗原に対して特異的に結合すること、およびその反応〔抗体Ab+抗原Ag→(抗体抗原AgAb)〕が凝集反応の原理に従うこと等の利点を有している。

最近、様々な免疫検定法の技術が利用されており、これらはその結合の性質によって分類することができる。最も一般的に利用されているものとして、競合的結合測定法(Competitive Binding Assay)および非競合的サンドイッチ型測定法(Non-competitive Sandwich Assay)を挙げることができる。どのような技術を用いるとしても、標識化された抗体または抗原の結合体を検出において使用しなければならない。最も広範囲に使用されている標識としては、放射性同位体、酵素お

を検出するための手段としての放射性活性に代えて、酵素または蛍光体を利用するものである。

イングウォール(Engwall)およびペールマン(Perlman)がイムノケミストリー(Immunology) 8:871(1971)に最初に記載して以来、標識物質として酵素を用いる方法が発展してきた。これに関する記載の例としては、米国特許第3,654,090号、同3,791,932号、同3,850,752号および同3,879,262号各明細書の記載およびジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド(Journal of Immunological Methods) 1:247(1972)およびメソッド・オブ・エンザイモロジー(Methods of Enzymology) 70:419(1980)の記載を挙げることができる。上記記載中の各方法は、ヘテロジニアスEIA(Heterogenous EIA)測定原理に基づくものである。この測定原理には、未反応の酵素標識された結合体から反応済の酵素標識された成分を分離する工程が含まれる。これらの検定法は、体液中に存在する分子量一万以上の抗原また

よび蛍光体を挙げるることができる。これらの標識を利用する方法はそれぞれ順に、ラジオイムノアッセイ〔以下RIAと略す場合もある〕、エンザイムイムノアッセイ〔以下EIAと略す場合もある〕及び蛍光イムノアッセイ〔以下FIAと略す場合もある〕と呼ばれている。

標識として放射性同位元素 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ あるいは $^3\text{H}$ を利用するラジオイムノアッセイは、非常に高感度であるため、現在でも最も広範囲に使用されている免疫検定法である。上記RIAの多くは、 $10^{-16}$ モル程度の微量な抗原または抗体を検出することができる。RIAはこのように高感度ではあるが、高エネルギーのガンマ線およびベータ線を放出する同位体を検出法に用いる危険性および放射性廃棄物の処理問題等から生じる多くの不利な点が存在する。近年、RIAと同程度の感度および測定の迅速性を有する新しいエンザイムイムノアッセイ・システムおよび蛍光イムノアッセイ・システムを開発する試みが多くなされている。これらのシステムは、抗原・抗体結合反応

は抗体等の物質の検出と測定に特に適している。

また、バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Comm.) 47:848(1972)および米国特許第3,817,837号明細書に記載されているホモジニアス・エンザイムイムノアッセイも重要である。これらの検定法では、ハプテン(Hapten)と酵素の関係が、ハプテンが抗体に結合すると、酵素活性が変化するようになっている。ホモジニアスEIAでは分離工程を必要としないため、通常これらの方法は非常に迅速に実施できる。これらの検定法は、治療薬レベルの測定、誤用薬の検定および他の分子量一万以上の抗原性物質の測定等、非常に広範囲に利用されている。

蛍光イムノアッセイは、RIAの感度とほぼ等しい感度を有している。高くかつ変動するブランクが非常にしばしば出現するため、この方法はRIAに比較して信頼度が低い。いくつかの代表的なFIA測定原理は、メソッド・オブ・エンザイモロジー(Methods of Enzymology) 74:3, 28,

80、78および87 (1981) および米国特許第3, 901, 654号明細書に記載されている。

化学ルミネセンスもまた、免疫検定法の処理に利用されてきた。化学ルミネセンスは、化学変化の結果として生じる光に関するものである。これには、化学反応の自由エネルギーの光エネルギーへの変換が含まれる。よく知られている化学ルミネセンス反応には、酸化剤として過酸化水素を使用し、そして触媒（例、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ または $\text{Co}^{2+}$ ）の存在下での、塩基性溶液中におけるルミノール（5-アミノ-1, 4-ジヒドロキシフタラジン）の酸化がある。いくつかの化学ルミネセンス免疫検定法の代表的な方法は、米国特許第4, 104, 029号、同4, 375, 972号、同4, 380, 580号の各明細書に記載されている。

免疫検定法の処理における標識手段として用いる電子スピン共鳴については、米国特許第3, 850, 578号明細書に記載されている。この方法は、比較的高価な装置および標識（潜在的な

発癌性物質である）を生じる自由電子を必要とする。

エンザイムイムノアッセイは、臨床分析の分野ばかりでなく、微生物学、ウイルス学、生化学、組織培養および免疫学の分野にもその適用範囲が広がっている。これらの検定法のうち、代表的なものとして、多数の試験を並行して作業処理するのに便利のように、96個のウェル（Well; 8×12配置）が設けられているプラスチック製マイクロ滴定皿（Microtiter Dish）中で実施する方法を挙げることができる。上記くぼみ（容量、0.3 ml）は分光光度計のキュベットのようになり、自動X-Y移動および表示機構を備えた高速比色計を用いて、垂直軸方向にそれぞれの内容物の吸光度が読み取られるように機能する。市販のマイクロ滴定皿を用いるE T Aは、ほとんど全てヘテロジニアス・イムノアッセイであり、ウェルの固体表面への第一抗体または抗原の物理的吸着を用いている。個々の抗体または抗原の三次構造は様々であるが、蛋白質とポリマーの間における

弱い疎水性のファン・デル・ワールス力の相互作用により、約1乃至200 ng/cm<sup>2</sup>の比較的低い結合密度が得られる。抗体と抗原の吸着結合は測定範囲に明確な限界があり、また低い結合密度および抗体・抗原複合体の多様な脱着による誤差が生じるものであるが、上記吸着結合は、依然として、サンドイッチ型のE I AとF I Aのみならず、ヘテロジニアスな競合的R I Aでも広く用いられている。

最近、抗体または抗原を固相（例、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド 34:315 (1980)に報告されたポリスチレン・ビーズ）に共有結合を介して付着させるいくつかの方法が開示された。上記方法においてポリスチレン・ビーズは、硝酸で処理され、そして亜二チオン酸ナトリウムのアルカリ性溶液で還元されて、アミノポリスチレン表面が形成される。上記ビーズはグルタルアルデヒドを用いて活性化され、抗体を共有結合するために使用される。これらの共有結合により固定化された抗体を生成するビーズは、さらに

サンドイッチ型イムノアッセイにおいても使用された。抗体が共有結合したポリスチレン・ビーズを用いるこれらの検定法では、抗体の表面密度が高いこと、インキュベーション時間が短縮されたことおよび精度と測定範囲が改善されたこと等が認められた。類似した方法が、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド 57:87 (1983)に記載されている。上記方法では、マンソン住血吸虫（*Schistosoma mansoni*）抗原を96個のウェルが設けられているポリスチレン製マイクロ滴定皿の表面に共有結合により付着させる。上記マイクロ滴定皿は、のちにエンザイムイムノアッセイにおいて患者の血清中の抗体測定にも使用された。上記操作において、アミノポリスチレン表面は、氷酢酸中の発煙硝酸の混合物を用いるニトロ化反応およびアルカリ性亜二チオン酸ナトリウムを用いる還元により、ウェル中に形成される。抗原性蛋白質は、単一の蛋白質を結合させる短鎖のカップリング分子として作用するN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミ

ドおよびスベリン酸を用いて、上記アミノポリスチレン表面に結合させる。この報告はまた共有結合された抗原を用いて行なう上記検定法が、物理的に吸着された抗原を用いるものと比較してより高い感度を有することを示している。

#### 〔発明の要旨〕

本発明は、抗体あるいは抗原のような分子を共有結合により各種ポリマー表面に固定化するための新規方法および手段を提供するものである。また本発明は免疫検定法への適用において、検出および定量対象物質の広い濃度範囲において直線的な検出関係が得られる器具を提供するものでもある。さらに本発明は測定または生産を目的として、活性アミノ基を有する全ての分子の固定化に利用することができる。例えば、酵素の固定化、DNAの固定化、細胞の固定化、ビールの固定化、バクテリアの固定化、あるいはアフィニティークロマトグラフィー等に利用することができる。

本発明の器具は、プラスチック製構造体（例、

にグラフト重合を開始させることで上記ポリマー表面に共有結合で付着させる。モノマーの一つは、 $\text{CH}_2=\text{CRWZ}$ （Z基は、蛋白質の反応性アミノ酸基と化学的に反応することができる）の構造を有している。よって蛋白質は、スペーサー分子に共有結合で付着する。第二のモノマーは、スペーサー分子にそって活性基Zを間隔を空けて配置する。また上記モノマーは、 $\text{CH}_2=\text{CRY}$ （Y基は、長いスペーサー分子に必要なだけの親水性を与えることができる基である）の構造を有している。上記モノマーのグラフト重合は、様々な溶媒またはそれらの混合物中で、光化学的にグラフト重合を開始させる方法においては0℃から、化学的にグラフト重合を開始させる方法においては40℃から、これらの溶媒の沸点温度までの温度範囲で、そして不活性な気体中において実施することができる。グラフト化が終了したのち、グラフト化したプラスチック性構造体を洗浄して、未反応のモノマー、グラフト化していないポリマー、有機溶媒および開始剤の残渣を除去す

小びん、キュベット、ビーズ、96個のウェルが設けられているマイクロ滴定皿）の形態をとるものである。免疫検定法への適用において抗体は、新規方法を用いて共有結合によって上記構造体に固定化することができ、そしてヘテロジニアス・エンザイムイムノアッセイまたは蛍光イムノアッセイにおいて使用することができる。上記の方法は、単に粘着性の蛋白質の結合を利用した先行技術よりも簡便であり、かつ現状の共有結合系を利用する技術よりも精度が高い。

本発明においては例えば、サンドイッチ型のエンザイムイムノアッセイまたは蛍光イムノアッセイにおいて非標識抗体として使用する抗体（蛋白質）は、長いスペーサー分子（スペーサー自身も共有結合によりポリマー表面に付着している）に共有結合させることにより、重合体表面に共有結合で固定化することができる。上記スペーサー分子は合成ポリマーである。スペーサー分子は、二またはそれ以上の適当なモノマーおよびフリー・ラジカル発生系を用いて、化学的または光化学的

る。そして水性緩衝溶液中で抗体を、活性化されたスペーサー分子に共有結合で固定化する。固定化された抗体を含むプラスチック性構造体は、（スペーサー分子上に残る活性基を中和したのち）乾燥して、競合的エンザイムイムノアッセイ、サンドイッチ型のエンザイムイムノアッセイまたは蛍光イムノアッセイにおいて使用することができる。

したがって本発明は、有効なアミノ基を含む分子の固定化において使用する表面処理を施した重合物質を提供する。上記物質はこれに結合する複数のポリマーを有し、上記ポリマーは少なくとも二つのモノマーの混合物より生成され、上記モノマーのうちの一つは上記固定化される分子中のアミノ基に結合するために有効な活性基を含み、そして多数の上記活性基が上記物質との間に間隔を置いて上記ポリマー上に分散している。本発明は、上記物質とポリマーの結合物の製造方法および免疫検定法の処理方法に特有な使用方法をも提供する。

それゆえ免疫検定法に本発明を適用することにより、現在抗原性物質としてヘテロジニアス・エンザイムイムノアッセイまたは蛍光イムノアッセイにおいて使用されている、粘着により固定化された多クローン性の抗体に代えて、長いスペーサー分子（スペーサー自身も共有結合で重合物質である支持体に付着している）を介して共有結合で固定化された抗体を用いることができる。よって本発明は、体液中に存在する様々な種類の抗原性物質やその他の生物学的物質の濃度または存在を検出するために有益である。本明細書では本発明を、免疫検定法の処理方法等における抗原および抗体の固定化を参照しながら記述する。それゆえ、本明細書で使用される抗原または抗原性物質という言葉は一般に、これに対する多クローン性または単クローン性抗体が生産され得る物質を言う。本発明の方法で検定することができる特定の抗原としては、ヒトのIgG、ヒトのIgM、ヒトのIgA、マウスのIgGおよびヒトのフィブリノーゲン等を挙げることができる。

理方法および活性化されたスペーサー分子による抗体の共有結合による固定化を説明する構成図である。

第2図は、マウスのIgGおよびヒトのIgGとIgMについての三種類のエンザイムイムノアッセイにおいて、従来の粘着により結合した多クローン性抗体を用いて得られた結果を示す。抗原濃度の自然対数（log）に対する吸光度のプロットを標準誤差線（3 $\sigma$ ）と共に示す。

第3図は、マウスのIgGおよびヒトのIgGとIgMについての三種類のエンザイムイムノアッセイにおいて、長いスペーサー上に共有結合で固定化された多クローン性抗体を用いて得られた結果を示す。抗原濃度の自然対数（log）に対する吸光度のプロットを標準誤差線（3 $\sigma$ ）と共に示す。

前述したように本発明は特に、抗体または抗原の固定化を参照しながら記述する。

本発明に従う、スペーサー分子を介して抗体または抗原を重合体表面に共有結合で付着させる代

本発明はまた、各種ホモジニアスな競合的ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ及び蛍光イムノアッセイに使用できる共有結合による抗原の固定化にも有益である。本発明により共有結合で固定化される特定の抗原の例としては、プロテインAが挙げられる。

しかしながら本発明は、有効なアミノ結合基を有する分子をプラスチック性物質に結合させることで、分析や生産等を目的として上記分子を固定化するためにも利用することができる。たとえば本発明は、ポリペプチド、多糖類、あるいは酵素のような蛋白質、DNA、ビールス、バクテリアまたは細胞等を共有結合で固定化するために利用することができる。

#### 〔発明の詳細な記述〕

本発明の上記およびその他の特徴については、添付した図面を参照しながら以下において詳細に記述する。

第1図は、ポリマー表面に共有結合で付着した長いスペーサー分子の形成におけるグラフト化処

理的な方法は、本発明の第1図に示されている。この方法の主な特徴は、共有結合の使用（結果として、ポリマー表面と抗体を不可逆的な固定化となるように結合させる）だけでなく、抗体分子とポリマー表面との間に合成鎖状分子（本明細書ではスペーサー分子として記述する）を介して間隔を置くことでもある。

以下において詳細に説明するが、スペーサー分子は、数種類のモノマーをグラフト化することにより形成され、プラスチック性物質のポリマー表面に共有結合で付着する鎖状ポリマーを生じる。モノマーの一つは、スペーサー分子にそって分散し抗体に共有結合する活性部位「Z」を供給する。ゆえに測定対象となる抗原は、抗体および分析を目的として抗原を追跡するトレーサーあるいは標識化された抗体に結合させることができる。

長い（上限は、数百オングストロームまでの長さ）スペーサー分子によりポリマー表面に結合された抗体分子は、吸着した抗体分子（実質的にポリマー表面上で固定化されている）と比較して、



並行運動および回転運動の自由が増大し、溶解した分子に非常に類似した動きを示す。離れているが、固定化されている抗体分子の並行運動および回転運動に関する高い自由度は、代表的な親合的イムノアッセイにおいて抗原結合の反応速度を向上させる。この効果は、酵素と結合した第二抗体の存在がさらにサンドイッチ複合体周囲の立体的凝集を促進するサンドイッチ型のエンザイムイムノアッセイにおいて、なおいっそう顕著である。この処理方法では、抗原の結合および第二抗体・酵素間の結合に要するインキュベーション時間は、測定結果の明らかな劣化を生じることなく大幅に減少させることができる。

加えて本発明には、ポリマー表面上に共有結合で固定化された抗体または抗原の密度の制御において優れていることが認められる点も重要である。粘着性結合により得られた抗体および抗原のタンパク表面密度は非常にバラツキがあり、蛋白質の構造、塗布液中に使用された蛋白質濃度、温度およびpH等の吸着処理が行なわれた時の条

件、これらの抗体または抗原が吸着されるプラスチックの表面構造等によって変化する。先行技術において実施された種類の粘着結合は、一般に利用可能な収量が低いという欠点があるが、プラスチック表面における抗体の密度は許容し得るものである。抗原、特に低分子量の抗原の粘着結合はさらに不安定であり、抗原の低表面密度はこれらの分析の感度および分析量の範囲(Dynamic Range)に重大な影響を及ぼすことがある。第1図に示すように、リシン残基よりの自由アミノ基を有する抗体または抗原は、スペーサー分子上の活性基と反応して、蛋白質分子を永続的に固定する共有結合を形成する。それゆえ上記処理操作において、結合した抗体または抗原の収量は、先行技術である粘着結合と比較して大幅に増大する。さらに上記収量は、スペーサー分子上の反応性基のクエンチング反応によって容易に制御することもできる。

さらに本発明は先行技術と比較して、非特異的タンパク結合の制御により優れていることが認められる。蛋白質の非特異的結合(例、抗体・酵素結合体)は、確実に実証されている現象であり、おそらくヘテロロジニアス・イムノアッセイにおける誤差の主要な原因の一つである。標準的な粘着によるエンザイムイムノアッセイおよび蛍光イムノアッセイにおける非特異的タンパク結合は、全ての分析溶液中に適当な蛋白質(例、ウシ血清アルブミン[Bovine Serum Albumin; BSA]、ブタのゼラチン)を高濃度で使用することにより、プラスチック表面を飽和させ、抗体・酵素結合体または抗体・蛍光体結合体の非特異的結合を減少させて防止する。BSA分子を用いる上記表面の飽和は、抗体・抗原複合体の周囲の立体的凝集を増加させることで抗体・酵素結合体の結合を減少させるものであるが、一方では免疫検定法の感度を減少させてしまう。しかし本発明においては、抗体または抗原分子は長いスペーサー分子を介してポリマーに共有結合しているため、上記スペーサーが効果的に上記分子をBSAやゼラチンにより飽和されている表面から隔離し、よって立体的

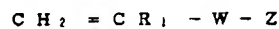
凝集は無視できる程度となる。さらにスペーサー分子の形成において適当なモノマーを用いることで上記スペーサー分子に、スペーサー自体が非特異的結合を妨害する親水性の性質をもたせることもできる。

さらに本発明は先行技術と比較して、非特異的タンパク結合の制御により優れていることが認め

られる。蛋白質の非特異的結合(例、抗体・酵素結合体)は、確実に実証されている現象であり、おそらくヘテロロジニアス・イムノアッセイにおける誤差の主要な原因の一つである。標準的な粘着によるエンザイムイムノアッセイおよび蛍光イムノアッセイにおける非特異的タンパク結合は、全ての分析溶液中に適当な蛋白質(例、ウシ血清アルブミン[Bovine Serum Albumin; BSA]、ブタのゼラチン)を高濃度で使用することにより、プラスチック表面を飽和させ、抗体・酵素結合体または抗体・蛍光体結合体の非特異的結合を減少させて防止する。BSA分子を用いる上記表面の飽和は、抗体・抗原複合体の周囲の立体的凝集を増加させることで抗体・酵素結合体の結合を減少させるものであるが、一方では免疫検定法の感度を減少させてしまう。しかし本発明においては、抗体または抗原分子は長いスペーサー分子を介してポリマーに共有結合しているため、上記スペーサーが効果的に上記分子をBSAやゼラチンにより飽和されている表面から隔離し、よって立体的

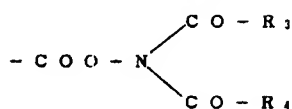
凝集は無視できる程度となる。さらにスペーサー分子の形成において適当なモノマーを用いることで上記スペーサー分子に、スペーサー自体が非特異的結合を妨害する親水性の性質をもたせることもできる。

本発明において、抗体または抗原を重合体(プラスチック製)の構造体に共有結合させる方法は、二段階の工程からなる。第1図に示すように、まずスペーサー分子をプラスチック構造体の表面上に、二またはそれ以上のモノマーのグラフト化を化学的または光化学的に開始する処理方法を用いて形成する。ついで上記スペーサー分子に抗体または抗原を共有結合させる。上記モノマー(グラフト重合させて、よってポリマー表面上でスペーサー分子を形成する)のうちの一つは、下記一般構造式を有するビニル・モノマーであることが好ましい。



R<sub>1</sub>基は、水素原子、メチル基、または炭素原子数16以下、好ましくは炭素原子数1乃至6で

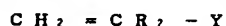
ある脂肪族あるいは芳香族よりなる基である。Z基は活性ニステル基であり、下記一般構造式よりなることが必要である。



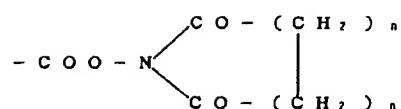
R<sub>3</sub>基およびR<sub>4</sub>基は、水素原子であるか、または炭素原子数16以下、好ましくは炭素原子数1乃至6である炭化水素基であって、炭化水素基の構造は脂肪族、芳香族あるいは脂肪族と芳香族の両方よりなり、複素原子として酸素原子、窒素原子、硫黄原子、フッ素原子、臭素原子および塩素原子を有することができる。R<sub>3</sub>基およびR<sub>4</sub>基は互いに結合していても互いに結合していなくてもよく、R<sub>3</sub>とR<sub>4</sub>が結合している場合には、両者が芳香族よりなる基を形成してもよい。Z基の好ましい構造の一つは、下記一般構造式の活性エステル基を含む。

においてもアミド形成反応の高い収量を保証する。上記活性エステル基の他の好ましい特徴としては、上記エステル基をアンモニウム・イオンあるいは化合物を含む第一級アミノ基によって容易に抑制できるため、蛋白質結合を適切かつ好ましく制御することが可能である点を挙げることができる。

グラフト重合させてスペーサー分子を形成する第二のモノマーは、下記一般式を有している。



上記一般式において、R<sub>1</sub>は水素原子、メチル基、または炭素原子数16以下、好ましくは炭素原子数1乃至6である脂肪族あるいは芳香族よりなる基である。Y基は炭素原子数16以下の脂肪族および/または芳香族よりなる基であり、複素原子として酸素原子、窒素原子および硫黄原子を含むことができる。上記基は、スペーサー分子上の活性Z基と重合物質との間に間隔を与え、またスペーサー分子に好ましい親水性を与える。上記Y基は炭素原子数1乃至6である脂肪族よりなる

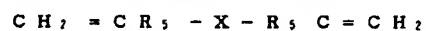


上記一般構造式において、nは1、2または3である。

Z基をビニル基に結合させるW基は、炭素原子を16個以下、好ましくは1乃至6個有し、その構造は脂肪族、芳香族あるいは脂肪族と芳香族の組合せよりなる。またW基は、複素原子として酸素原子、窒素原子および硫黄原子を含むことができる。上記活性エステルはN-ジアルキルヒドロキシルアミンの誘導体であって、蛋白質中のリシン残基上のアミノ基と容易に反応してアミド誘導体を形成することが知られている。上記アミド誘導体を介して蛋白質分子は、活性エステルを有する基に共有結合する。上記アミド形成反応は、pH 7.5から8.5の範囲の至適pHを有している。また上記アミド形成反応は、約10<sup>4</sup>という非常に高いアミノ分解/加水分解比を有することが知られており、そのため非常に低く蛋白質濃度

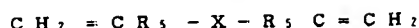
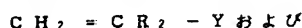
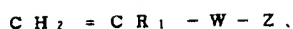
基であることが好ましい。特に比較的親水性であるスペーサーが必要とされる場合には、Y基は水酸基、アミドおよびカルボキシル基あるいはこれらに類似した親水性基を含有することが好ましい。

またさらに、第三のモノマーもグラフト重合させてスペーサー分子を形成することができる。第三のモノマーは下記一般構造式を有している。



上記一般構造式において、R<sub>5</sub>は水素原子、メチル基、または炭素原子数16以下、好ましくは炭素原子数1乃至6である脂肪族あるいは芳香族よりなる基である。X基は、炭素原子を16個以下有し、その構造は脂肪族、芳香族あるいは脂肪族と芳香族の組合せよりなる。またX基は、複素原子として酸素原子、窒素原子および硫黄原子を含むことができる。またX基は、炭素原子を1乃至6個有することが好ましい。上記ジビニル化合物は、架橋剤または分岐剤として加え、スペーサー分子の構造に作用させる。

グラフト化処理操作において使用する上記モノマー



のモル比が、スペーサー分子上の活性基（結合部位）の数と間隔、スペーサー分子の親水性およびスペーサー分子の架橋構造を決定する。上記方法が、高濃度物質の正確な測定を可能にするために必要である、より広い間隔をもって配置された結合部位を作り出すことは明らかであろう。

化学的に開始するグラフト化処理は、アゾ化合物、有機過酸化物および過酸エステルのようなフリー・ラジカルを生じる化合物によって開始する。上記化合物は全て一定の温度で分解し、重合およびグラフト化反応を開始するフリー・ラジカル種を生成する。上記化学的に開始するグラフト化処理は、40℃から上記処理に使用する溶媒の沸点の範囲内の温度で実施する。最も適している溶媒は、良好な溶解度を有し、モノマーに対して

用いることで容易に発生する。通常の場合、本発明に使用するUV照射のエネルギー密度は、25 Wh/m<sup>2</sup>から100 Wh/m<sup>2</sup>の範囲内である。上記光グラフト化処理操作は、0℃から上記処理に使用する溶媒の沸点までの温度で実施する。

化学的に開始するグラフト化に使用するものと同じ種類の溶媒を、光グラフト化処理操作にも使用することができる。上記溶媒のうち最も代表的であるものは、アルコール、エーテル、エステルおよびケトンである。好ましい光開始化合物は、三重項エネルギー（Triplet Energy; ET）が67キロ・カロリー／モルのベンゾフェノンであることが知られている。また不活性な気体は一般に、大気圧下の窒素またはアルゴンにより得られる。反応時間は様々であるが、通常は10分から2時間までである。

グラフト化したプラスチック製構造物は、有機溶媒および脱イオン水を用いて洗浄し、沈殿したコポリマー、有機溶媒、未反応のモノマーおよび開始化合物の分解産物を除去する。グラフト化し

不活性であり、グラフト化したプラスチック製構造物を溶かしたり膨張させたりすることがなく、そして50℃以上の沸点を有するものである。使用できる溶媒の種類の例としては、アルコール、エーテル、エステルおよびケトン等を挙げることができる。グラフト化処理操作は全て不活性な気体中で行なわれねばならない。たとえば、大気圧あるいはそれ以上の圧力下において、窒素またはアルゴン中で行なう。反応時間は様々であるが、通常は2時間から10時間の範囲内である。

光化学的に開始するグラフト化処理は、UV照射および芳香族ケトンのようなフリー・ラジカルを生じる光活性化合物を用いる。上記化合物は、高量子収量を有する特定波長の紫外線を吸収し、グラフト化および重合反応を開始するフリー・ラジカル種を生成する本発明に使用する好ましい紫外線としては、320から400nm、好ましくは360nm前後の近紫外線を挙げるができる。上記領域のUVスペクトルは、黒色蛍光放電灯、高圧水銀放電灯あるいはキセノン放電灯を

たプラスチック製構造物は、一般に直ちに抗体または抗原の結合に使用するが、あるいは単に真空乾燥してポリエチレンの袋に密閉し冷蔵することもできる。無水条件下で保存した場合には、グラフト化したプラスチックは少なくとも六カ月間、抗体または抗原を共有結合で固定化する活性が残存することが解っている。

使用され得る代表的なプラスチック物質としては、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネートおよびポリアクリレートを挙げるができる。

抗体または抗原をスペーサー分子に共有結合させる処理は、水性かつ非求核性の緩衝溶液中、pH7.5から8.5の範囲内および0℃から37℃の範囲内の温度で実施する。反応時間は、1時間から18時間までの短時間である。結合溶液中の蛋白質濃度は、100mg/ml程度の低濃度とすることができるが、抗体を用いる場合には約5μg/ml程度とするのが一般的である。抗体または抗原で被覆されたプラスチック表面の

表面安定化処理を、ウシ血清アルブミン、卵アルブミン、ツイーン-20 (Tween-20; 登録商標) のような非イオン性界面活性剤あるいはこれらの混合物を含む溶液を用いて行なう。場合によっては、スペーサー分子上に残存する活性エステル基を抑制するために、安定化溶液中に一定量のアンモニウム・イオンを含有させる方が有利である。抗体または抗原で被覆されたプラスチック表面は凍結乾燥して無水条件下、氷点下の温度で少なくとも12カ月間保存できる。

本発明の結合した構造体を用いることで、より高濃度の物質を測定対象として把握できるばかりでなく、物質の光学透明度が高濃度における適用でも保たれ、よって分析対象である結合物質の正確な測定が可能となる。

以下に例示するマウスのIgG、ヒトのIgA、ヒトのIgG、ヒトのIgMおよびヒトのフィブリノーゲンのエンザイムイムノアッセイは、ヤギまたはウサギの多クローン性抗体を用いて実施した。上記の検定法は全て、酵素触媒により形

成された生産物の測光または蛍光測定に第二抗体・酵素結合体を使用するサンドイッチ型である。抗体・酵素結合体には、基質としてp-ニトロフェニル・フォスフェートを用いるアルカリ性フォスファターゼまたは色原体として2, 2'-アゾージ- (3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホネート) (ABTS; 登録商標) を用いるワサビダイコンのペルオキシダーゼのうちいずれかを使用した。アルカリ性フォスファターゼ結合体には、蛍光物質4-メチルウンベリフェリル・フォスフェート (4-methylumbelliferyl phosphate) も使用した。酵素生成物の測光測定には、96個のウェルが設けられているプレートのリーダー (ダイナテック社製MR600) を使用した。蛍光測定法は、96個のウェルが設けられているプレートのリーダー (ダイナテック社製マイクロフルオロ; 登録商標) を使用した。

第2図および第3図に示すように、吸着により抗体を被覆した96個のウェルが設けられているプレートおよび上記本発明の共有結合で固定化し

たプレートを用いたマウスのIgG、ヒトのIgGおよびヒトのIgMのエンザイムイムノアッセイを順次比較することにより、抗体を吸着した検定法は抗原の高濃度領域において低下することが容易に認められる。第2図のプロットにおいて重複して記載した誤差線によって示される利用可能な検出範囲は、吸着により被覆したプレートに対して抗原が0.8 ngから20 ngまでである。第3図に示される共有結合で被覆したプレートでは、利用可能な検出範囲は0.8 ngから200 ngまでの抗原に拡張される。さらに本発明の共有結合で固定化した抗体を用いると、誤差線 (3σ) は明らかに縮小する。これは抗体濃度が高いこと、抗体が重合体表面に永続的に固定化されていること、あるいは抗体を固定化し抗体の運動に高い自由度を与える長いスペーサー分子によって立体的凝集が低下すること等によるものである。

本発明のグラフト化した重合物質は免疫検定法の処理方法の他にも、スペーサー分子上に設けられる活性基 (すなわち活性エステル基) に結合す

#### [実施例1]

アクリルアミド (純度は電気泳動に使用する程度) 1.50 gおよびN-アクリルオキシスクシンイミド 1.00 gを2-プロパノール (水分含有量0.2%以下) 70.0 ml中に、25℃にてマグネチックスターラーを用いて溶解した。2, 2'-アゾビス- (2-メチルプロピオニトリル) (AZOBIS) 50 mgをアセトン0.50 ml中に溶解し、この溶液を上記2-プロパノール溶液に加えて、さらに2分間マグネチック

スターラーを用いて攪拌したのち、焼結ガラス製フィルターで濾過した。

96個のウェルが設けられているポリスチレン製のマイクロ滴定プレート（リンブロ [Limbro] 社製）二枚に、フリーラジカルを生成するAZO BISおよびモノマーを含む上記濾過した2-プロパノール溶液を、ウェル当り0.280mlになるように充填した。プレートは57℃に熱した真空オーブン中に入れた。上記オーブンは圧力が100ミリバールに低下するまで急速に吸引し、そして圧力が1000ミリバールに達するまで純粋（99.9%）アルゴンを満たした。さらにオーブン中の酸素濃度を低下させるため、上記操作を二回以上繰り返した。プレートはオーブン中に57℃で4.5時間置かれた。約1時間でウェル中に白色沈殿が現れた。4.5時間後プレートをオーブンより取り出して、30分間放置冷却し、96個のウェルが設けられているマイクロ滴定プレートの洗浄装置で脱イオン水を用い5回洗浄した。二枚のプレートの洗浄操作に要した時間は3

分未満であった。

洗浄したプレートのウェルに、ヤギの抗マウスIgG抗体（タゴ [Tago] 社製、アフィニティー精製）溶液（pH8.5の0.05M磷酸ナトリウム緩衝液中に抗体5μg/ml含有）0.15mlを充填した。プレートは20℃で1時間放置したのち、4℃で18時間保存した。さらにプレートを脱イオン水で3回洗浄し、それぞれのウェルに1%のウシ血清アルブミンと0.02%のアジ化ナトリウムを含むpH8.5の磷酸ナトリウム緩衝液0.300mlを充填した。プレートは4時間20℃に、さらに18時間4℃に保った。そして再度上記プレートを脱イオン水で3回洗浄した。

抗原または試料の標本を1%のウシ血清アルブミン、0.02%のアジ化ナトリウム、および塩化カルシウム2mMを含むpH8.2の0.1Mトリス・塩酸緩衝液中に希釈して、上記ウェルに0.150ml容量加えた。各試料あるいは標準試料は少なくとも三組について分析を行なった。

標準試料はウェル当り0.8ngから200ngの範囲で使用した。プレートは18時間4℃でインキュベートした。酵素・抗体結合物を加えるまえに、再度上記プレートを脱イオン水で3回洗浄した。ヤギの抗マウスIgG抗体・アルカリ性フォスファターゼ結合物（タゴ社製、アフィニティー精製）を、1%のウシ血清アルブミン、0.02%のアジ化ナトリウムおよび塩化カルシウム2mMを含むpH8.2の0.1Mトリス・塩酸緩衝液中に存在比1:1000となるように希釈した。結合物溶液0.150mlをブランクとなるウェルを除く各ウェルに配分した。上記プレートは、37℃で2時間そして20℃で1時間インキュベートした。脱イオン水で3回洗浄したのち、ウェルに0.5mMのp-ニトロフェニル・フォスフェート溶液（塩化マグネシウム2mMおよび塩化亜鉛0.5mMを含むpH8.2の1.0Mトリス・塩酸緩衝液中）0.150mlを充填した。ウェルの410nmにおける吸光度の増加率は、デジタル・エキップメント（Digital Equi-

ment）社のVAN11/750コンピューターに接続させたダイナテック社製MR600の自動プレート・リーダーで読み取った。上記コンピューターは、動力学的データをそのまま受け取り、抗原濃度の自然対数（log）に対する吸光度のプロットおよび抗原濃度の自然対数（log）に対する変動値のプロットを行なうように、統計的およびグラフ的に処理する。

#### 〔実施例2〕

アクリルアミド（純度は電気泳動に使用する程度）1.50g、N-アクリルオキシスクシンイミド0.70gおよびN,N'-メチリンビス-アクリルアミド0.030gを2-プロパノール（水分含有量0.2%以下）70.0ml中に、25℃でマグネチック・スターラーを用いて溶解した。2,2'-アゾビス（2-メチルプロピオニトリル）（AZOBIS）50mgをアセトン0.50ml中に溶解し、この溶液を上記2-プロパノール溶液に加えて、さらに2分間マグネチック・スターラーを用いて攪拌したのち、

焼結ガラス製フィルターで濾過した。

96個のウェルが設けられているポリスチレン製マイクロ滴定プレート（リンプロ [Limbro] 社製）二枚に、フリーラジカルを生成するA Z O B I S およびモノマーを含む上記濾過した2-プロパノール溶液を、ウェル当り0.280mlになるように充填した。プレートは57℃に熱した真空オープン中に入れた。上記オープンは圧力が100ミリバールに低下するまで急速に吸引し、そして圧力が1000ミリバールに達するまで純粋（99.9%）アルゴンを満たした。さらにオープン中の酸素濃度を低下させるため、上記操作を二回以上繰り返した。プレートはオープン中に57℃で4.5時間置かれた。約1時間でウェル中に白色沈殿が現れた。4.5時間後にプレートをオープンより取り出し、30分間放置冷却し、96個のウェルが設けられているマイクロ滴定プレートの洗浄装置で脱イオン水を用いて5回洗浄した。二枚のプレートの洗浄操作に要した時間は、3分未満であった。

でインキュベートした。酵素・抗体結合体を加えるまえに、再度上記プレートを脱イオン水で3回洗浄した。

ヤギの抗マウスIgG抗体・ワサビダイコンのペルオキシダーゼ結合体（タゴ社製、アフィニティー精製）を、1%のウシ血清アルブミン、0.01%のメチオレートおよび1%の塩化ナトリウムを含むpH8.5の0.05M燐酸ナトリウム緩衝液中に存在比1:1000となるように希釈した。結合体溶液0.150mlをブランクとなるウェルを除く各ウェルに配分した。上記プレートは、20℃で1時間インキュベートした。脱イオン水で3回洗浄したのち、ウェルに0.1%の2,2'-アゾビス（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホネート）（ABTS）溶液（0.003%の過酸化水素を含むpH5.0のクエン酸/燐酸緩衝液中）0.150mlを充填した。ウェルの吸光度は410nmにおいて、デジタル・エキップメント社のVAN11/750コンピューターに接続させたダイナテック社製

洗浄したプレートのウェルに、ヤギの抗マウスIgG抗体（タゴ社製、アフィニティー精製）溶液（pH8.5の0.05M燐酸ナトリウム緩衝液中に抗体5μg/mlを含む）0.150mlを充填した。プレートは20℃で1時間放置したのち、4℃で18時間保存した。さらにプレートを脱イオン水で3回洗浄し、それぞれのウェルに1%のウシ血清アルブミンと0.02%のアジ化ナトリウムを含むpH8.5の燐酸ナトリウム緩衝液0.300mlを充填した。プレートは4時間20℃に、次に18時間4℃に保った。そして再度上記プレートを脱イオン水で3回洗浄した。

抗原または血清試料の標本を1%のウシ血清アルブミン、0.02%のアジ化ナトリウムおよび塩化カルシウム2mMを含むpH8.0の0.1Mトリス・塩酸緩衝液中に希釈して、上記ウェルに0.150ml容量加えた。各試料あるいは標準試料は少なくとも三組について分析を行なった。標準試料はウェル当り0.8ngから200ngの範囲で使用した。プレートは18時間4℃

MR600の自動プレート・リーダーで読み取った。上記コンピューターは、実施例1において記載したように統計的およびグラフ的な機能を行なう。

### 〔実施例3〕

アクリルアミド（純度は電気泳動に使用する程度）21.5gおよびN-アクリルオキシスクシンイミド10.0gの溶液を、2-プロパノール（水分含有量0.2%以下）1000ml中に、25℃でマグネチック・スターラーを用いて調製した。A Z O B I S 0.72gを含む別の溶液をアセトン5.0ml中に調製し、この溶液を攪拌下上記2-プロパノール溶液に加えた。上記溶液を焼結ガラス製フィルターで濾過したのち、96個のウェルが設けられているマイクロ滴定プレート（リンプロ社製）36枚のウェルに、ウェル当り0.280ml量を配分した。

上記プレートは57℃に熱した真空オープン中に入れた。上記オープンは圧力が100ミリバールに低下するまで急速に吸引し、そして圧力が

1000ミリバールに達するまで純粋(99.9%)アルゴンを満たした。さらにオープン中の酸素濃度を低下させるため、上記操作を二回以上繰り返した。プレートはオープン中に57℃で4.5時間置かれた。約1時間でウェル中に白色沈殿が現れた。4.5時間後プレートをオープンより取り出して、30分間放置冷却し、96個のウェルが設けられているマイクロ滴定プレートの洗浄装置で脱イオン水を用いて5回洗浄した。

洗浄したプレートのウェルに、ヤギの抗ヒトIgM抗体(タゴ社製、アフィニティー精製)溶液(pH8.5の0.05M燐酸ナトリウム緩衝液中に抗体5μg/mlを含む)0.150mlを充填した。プレートは20℃で1時間放置したのち、4℃で18時間保存した。さらにプレートを脱イオン水で3回洗浄し、それぞれのウェルに1%のウシ血清アルブミンと0.02%のアジ化ナトリウムを含むpH8.5の燐酸ナトリウム緩衝液0.300mlを充填した。プレートは4時間20℃に、さらに18時間4℃に保った。プレ

り0.280ml量を配分した。

上記プレートは57℃に熱した真空オープン中に入れた。上記オープン圧力は圧力が100ミリバールに低下するまで急速に吸引し、そして圧力が1000ミリバールに達するまで純粋(99.9%)アルゴンを満たした。さらにオープン中の酸素濃度を低下させるため、上記操作を二回以上繰り返した。プレートはオープン中に57℃で4.5時間置かれた。約1時間でウェル中に白色沈殿が現れた。4.5時間後プレートをオープンより取り出して、30分間放置冷却した。そしてプレートを、96個のウェルが設けられているマイクロ滴定プレートの洗浄装置で脱イオン水を用いて5回洗浄した。上記プレートを24時間25℃において0.1ミリバールの真空中で乾燥し、直ちにポリエチレンの袋(袋の中には、残りの湿気を吸着するドライエリット[DRIERITE; 登録商標]を入れる)に密閉した。なお上記ドライエリットは、スパーサー分子上の活性エステル基を加水分解する恐れがある湿気を吸収させる

ートを脱イオン水で3回洗浄し、残りの水をウェルから振り落して、最後にポリエチレンの袋に密閉して-18℃で保存した。

ヤギの抗ヒトIgM抗体を共有結合で固定化した上記のプレートは、-18℃で保存してから12カ月間、ヒトのIgMについてのエンザイムイムノアッセイにおいて何らの低下をも示さなかった。

#### [実施例4]

アクリルアミド(純度は電気泳動に使用する程度)19.3gおよびN-アクリルオキシスクシンイミド9.0gの溶液を、2-プロパノール(水分含有量0.2%以下)900ml中に、25℃でマグネチック・スターラーを用いて調製した。AZOBISを0.64g含む別の溶液をアセトン15.0ml中に調製し、この溶液を攪拌下上記2-プロパノール溶液に加えた。上記溶液を焼結ガラス製フィルターで濾過したのち、96個のウェルが設けられているマイクロ滴定プレート(リンプロ社製)36枚のウェルに、ウェル当

ためのものである。上記プレートは、20℃で保存した場合には3カ月間および4℃で保存した場合には6カ月間、抗体または抗原の結合に関する活性に何らの損失をも示さなかった。

#### [実施例5]

実施例2において記載した方法と同様に、96個のウェルが設けられているプレート(ダイナテック社製、マイクロフルオロ・B[Microfluor "B"]; 登録商標)二枚を、N-アクリルオキシスクシンイミドおよびアクリルアミドを用いてグラフト化し、ヤギの抗マウスIgG抗体(タゴ社製)で被覆した。

抗原または試料の標本を1%のウシ血清アルブミン、0.02%のアジ化ナトリウムおよび塩化カルシウム2mMを含むpH8.2の0.1Mトリス・塩酸緩衝液中に希釈して、ウェル当り0.150ml容量加えた。各試料あるいは標準試料は少なくとも三組について分析を行なった。標準試料は33ピコ・グラムから9.0ナノ・グラム(9000ピコ・グラム)の範囲で使用した。プ

レートは18時間4℃でインキュベートしてから、脱イオン水で3回洗浄した。

ヤギの抗マウスIgG抗体・アルカリ性フォスファターゼ結合体（タゴ社製、アフィニティー精製）を、1%のウシ血清アルブミン、0.02%のアジ化ナトリウムおよび塩化カルシウム2mMを含むpH8.2の0.1Mトリス・塩酸緩衝液中に存在比1:1000となるように希釈した。結合体溶液0.150mlを空白となるウェルを除く各ウェルに配分した。上記プレートは、37℃で2時間そして20℃で1時間インキュベートした。脱イオン水で3回洗浄したのち、ウェルに0.5mMの4-メチルウンベリフェリル・フォスフェート溶液（塩化マグネシウム2mMおよび塩化亜鉛0.5mMを含むpH8.2の1.0Mトリス・塩酸緩衝液中）0.200mlを充填した。蛍光の増加率は、ダイナテック社製マイクロフルオロ（MicroFLOUR; 商標）・リーダーMR600の自動プレート・リーダーで測定した。励起波長は350nmであり、発光は480nm

そして上記プレートを2時間37℃でインキュベートした。基質を加え、410nmで吸光度を読み取る等のその他の操作は、実施例1において記載した標準的な分析方法と同様であった。

#### 〔実施例7〕

実施例2において記載した方法と同様に、96個のウェルが設けられているマイクロ滴定用ポリスチレン製プレート（リンプロ社製）二枚を、N-アクリルオキシスクシンイミドおよびアクリルアミドを用いてグラフト化した。

プレートは、pH8.5の0.05M磷酸ナトリウム緩衝液中のヒトのフィブリノーゲンを用いて、一夜4℃において被覆する。10個のウェルをフィブリノーゲンの各濃度における試験に使用する。ウェル当り使用したフィブリノーゲンの量は、0.15ml容量に対し2000、500、100、50、10および1ngである。洗浄後、上記プレートをpH8.5の0.05M磷酸緩衝液中の1%BSA溶液を用いて4時間、室温不活性化する。

で測定した。動力学的データをそのまま、抗原濃度の自然対数（log）に対する蛍光（任意の単位）および抗原濃度の自然対数（log）に対する変動値のプロットを行なうように、統計的およびグラフ的处理の機能をするデジタル・エクイップメント社のVAN11/750コンピュータに送った。

#### 〔実施例6〕

実施例2において記載した方法と同様に、96個のウェルが設けられているマイクロ滴定用ポリスチレン製プレート（リンプロ社製）二枚を、N-アクリルオキシスクシンイミドおよびアクリルアミドを用いてグラフト化した。実施例1において記載した方法と同様に、上記プレートを抗体（ヤギの抗マウスIgG抗体）で被覆し、ついで1%のBSAを用いて不活性化した。ただし、緩衝液75μl中（希釈度1:500）のアルカリ性フォスファターゼで標識化した第二抗体を各ウェルに加え、直ちに同容量の緩衝液中の試料あるいは標準試料について同様の操作を繰り返した。

過剰量のBSAを洗浄により除去したのち、1%のNaCl、1%のBSAおよび0.01%のメチオレートを含む0.05M磷酸緩衝液中に存在比1:500に希釈された、ワサビダイコンのペルオキシダーゼで標識化されたヤギの抗ヒト・フィブリノーゲン抗体を上記プレートに加える。各ウェルは抗体0.15mlを収容する。プレートは1時間半、酵素と共に室温でインキュベートする。洗浄後、0.03%の過酸化水素を含むpH5.0のクエン酸/磷酸緩衝液中の1%ABTS・0.15mlを各ウェルに加える。基質を加えて5分後プレートを読み取る。

#### 〔実施例8〕

アクリルアミド（純度は電気泳動に使用する程度）1.50gおよびN-アクリルオキシスクシンイミド0.700gを2-プロパノール（水分含有量0.2%以下）70.0ml中に、25℃でマグネチック・スターラーを用いて溶解した。2,2'-アゾビス（2-メチルプロピオニトリル）（AZOBI S）50mgをアセトン0.



50 ml 中に溶解し、この溶液を上記2-プロパノール溶液に加えて、さらに2分間マグネチック・スターラーを用いて攪拌したのち焼結ガラス製フィルターで濾過した。

96個のウェルが設けられているポリビニル製マイクロ滴定プレート（ダイナテック社製）二枚に、フリーラジカルを生成するAZOBI S及びモノマーを含む上記濾過した2-プロパノール溶液を、ウェル当り0.20 ml になるように充填した。プレートは57℃に熱した真空オーブン中に入れた。上記オーブンは圧力が100ミリバールに低下するまで急速に吸引し、そして圧力が1000ミリバールに達するまで純粋（99.9%）アルゴンを満たした。さらにオーブン中の酸素濃度を低下させるため、上記操作を二回以上繰り返した。プレートはオーブン中に57℃で4.5時間置かれた。約1時間でウェル中に白色沈殿が現れた。4.5時間後プレートをオーブンより取り出して、30分間放置冷却し、96個のウェルが設けられているマイクロ滴定プレートの

洗浄装置で脱イオン水を用いて5回洗浄した。二枚のプレートの洗浄操作に要した時間は、3分未満であった。

洗浄したプレートのウェルに、ヤギの抗マウスIgG抗体（タゴ社製、アフィニティー精製）溶液（pH 8.5の0.05M燐酸ナトリウム緩衝液中に抗体5μg/mlを含む）0.150 mlを充填した。プレートは20℃で1時間放置したのち、4℃で18時間保存した。さらにプレートを脱イオン水で3回洗浄し、それぞれのウェルに1%のウシ血清アルブミンと0.02%のアジ化ナトリウムを含むpH 8.5の燐酸ナトリウム緩衝液0.20 mlを充填した。プレートは4時間20℃に、さらに18時間4℃に保った。そして再度上記プレートを脱イオン水で3回洗浄した。

抗原または試料の標本を1%のウシ血清アルブミン、0.02%のアジ化ナトリウムおよび塩化カルシウム2 mMを含むpH 8.2の0.1 Mトリス・塩酸緩衝液中に希釈して、上記ウェルに0.150 ml 容量加えた。各試料あるいは標準

試料は少なくとも三組について分析を行なった。標準試料はウェル当り0.8 ng から200 ng の範囲で使用した。プレートは18時間4℃でインキュベートした。酵素・抗体結合体を加えるまえに、再度上記プレートを脱イオン水で3回洗浄した。

ヤギの抗マウスIgG抗体・アルカリ性フォスファターゼ結合体（タゴ社製、アフィニティー精製）を、1%のウシ血清アルブミン、0.02%のアジ化ナトリウムおよび塩化カルシウム2 mMを含むpH 8.2の0.1 Mトリス・塩酸緩衝液中に存在比1:1000となるように希釈した。結合体溶液0.150 mlをブランクとなるウェルを除く各ウェルに配分した。上記プレートは、37℃で2時間そして20℃で1時間インキュベートした。

脱イオン水で3回洗浄した後、ウェルに0.5 mMのp-ニトロフェニル・フォスフェート溶液（塩化マグネシウム2 mMおよび塩化亜鉛0.5 mMを含むpH 8.2の1.0 Mトリス・塩酸

緩衝液中）0.150 mlを充填した。ウェルの410 nmにおける吸光度の増加率は、デジタル・エキップメント社のVAN 11/750コンピュータに接続させたダイナテック社製MR 600の自動プレート・リーダーで読み取った。上記コンピュータは、動力学的データをそのまま受け取り、抗原濃度の自然対数（log）に対する吸光度のプロットおよび抗原濃度の自然対数（log）に対する変動値のプロットを行なうように、統計的およびグラフ的に処理する。

#### 【実施例9】

アクリルアミド（純度は電気泳動に使用する程度）1.50 gおよびN-アクリルオキシシクシニミド0.70 gを2-プロパノール（水分含有量0.2%以下）70.0 ml中に、25℃でマグネチック・スターラーを用いて溶解した。a-クミルーベルオキシネオデカノエート（a-cumyl-peroxyneodecanoate）50.0 μlをアセトン0.50 ml中に溶解し、この溶液を上記2-プロパノール溶液に加えて、さらに2分間マグネチ

ック・スターラーを用いて攪拌したのち、焼結ガラス製フィルターで濾過した。

96個のウェルが設けられているポリスチレン製のマイクロ滴定プレート（リンプロ社製）二枚に、フリーラジカルを生成する $\alpha$ -キミルベロキシネオデカノエートおよびモノマーを含む上記濾過した2-プロパノール溶液を、ウェル当り0.280mlになるように充填した。プレートは57℃に熱した真空オープン中に入れた。上記オープンは圧力が100ミリバールに低下するまで急速に吸引し、そして圧力が1000ミリバールに達するまで純粋（99.9%）アルゴンを満たした。さらにオープン中の酸素濃度を低下させるため、上記操作を二回以上繰り返した。プレートはオープン中に57℃で4.5時間置かれた。約1時間でウェル中に白色沈殿が現れた。4.5時間後プレートをオープンより取り出して、30分間放置冷却し、96個のウェルが設けられているマイクロ滴定プレートの洗浄装置で脱イオン水を用いて5回洗浄した。二枚のプレートの洗浄機

標準試料はウェル当り0.8ngから200ngの範囲で使用した。プレートは18時間4℃でインキュベートした。酵素・抗体結合体を加えるまえに、再度上記プレートを脱イオン水で3回洗浄した。

ヤギの抗マウスIgG抗体・アルカリ性フォスファターゼ結合体（タゴ社製、アフィニティー精製）を、1%のウシ血清アルブミン、0.02%のアジ化ナトリウムおよび塩化カルシウム2mMを含むpH8.2の0.1Mトリス・塩酸緩衝液中に存在比1:1000となるように希釈した。結合体溶液0.150mlをブランクとなるウェルを除く各ウェルに配分した。上記プレートは、37℃で2時間そして20℃で1時間インキュベートした。脱イオン水で3回洗浄したのち、ウェルに0.5mMのp-ニトロフェニル・フォスフェート溶液（塩化マグネシウム2mMおよび塩化亜鉛0.5mMを含むpH8.2の1.0Mトリス・塩酸緩衝液中）0.150mlを充填した。ウェルの410nmにおける吸光度の増加率は、

作に要した時間は、3分未満であった。

洗浄したプレートのウェルに、ヤギの抗マウスIgG抗体（タゴ社製、アフィニティー精製）溶液（pH8.5の0.05M燐酸ナトリウム緩衝液中に抗体5 $\mu$ g/mlを含む）0.150mlを充填した。プレートは20℃で1時間放置したのち、4℃で18時間保存した。さらにプレートを脱イオン水で3回洗浄し、それぞれのウェルに1%のウシ血清アルブミンと0.02%のアジ化ナトリウムを含むpH8.5の燐酸ナトリウム緩衝液0.300mlを充填した。プレートは4時間20℃に、さらに18時間4℃に保った。そして再度上記プレートを脱イオン水で3回洗浄した。

抗原または試料の標準を1%のウシ血清アルブミン、0.02%のアジ化ナトリウムおよび塩化カルシウム2mMを含むpH8.2の0.1Mトリス・塩酸緩衝液中に希釈して、上記ウェルに0.150ml容量加えた。各試料あるいは標準試料は少なくとも三組について分析を行なった。

デジタル・エキップメント社のVAN 11/7000コンピュータに接続させたダイナテック社製MR600の自動プレート・リーダーで読み取った。上記コンピュータは、動力学的データをそのまま受け取り、抗原濃度の自然対数（log）に対する吸光度のプロットおよび抗原濃度の自然対数（log）に対する変動値のプロットを行なうように、統計的およびグラフ的に処理する。

#### 【実施例10】

アクリルアミド（純度は電気泳動に使用する程度）0.38gおよびN-アクリルオキシスクシンイミド0.25gを1-プロパノール（水分含量0.2%以下）70.0ml中に、25℃でマグネチック・スターラーを用いて溶解した。ベンゾフェノン1.25gを上記1-プロパノール溶液に加えて、さらに10分間攪拌したのち、焼結ガラス製漏斗で濾過した。96個のウェルが設けられているポリスチレン製マイクロ滴定プレート（リンプロ社製）二枚に、紫外線光の活性化によりフリーラジカル種を生成する光開始化合物で

あるベンゾフェノンおよびモノマーを含む上記濾過した1-プロパノール溶液を、ウェル当り0.280mlになるように充填した。プレートをガラス製の平底容器（長さ12インチ×幅12インチ×高さ2インチ）に入れ、15分間純粋アルゴン流を吹き付けて酸素を除去した。上記容器は、縦方向に互いに1/4インチ間隔で配列された九個の黒色光蛍光放電灯から垂直方向に1インチ上方に載置した。上記光源（シルバニア [Sylvania] 社製、F15T8/BLB 蛍光放電灯、18インチ×7/8インチ）は、上記グラフト化容器のガラス製底面において、360nmで40Wh/m<sup>2</sup>のUV照射エネルギーを発する。放電灯と容器は圧縮空気で冷却した。容器内温度を測定したところ25℃であった。

UV放電灯を点灯してから10分後に、ウェル中に白色沈殿が現れた。1時間後UV放電灯を消灯して、プレートを96個のウェルが設けられているマイクロ滴定プレートの洗浄装置で2-プロパノールを用いて2回洗浄し、水不溶性の光開始

設けられているポリ塩化ビニル製プレート（ダイナテック社製）二枚に、上記1-プロパノール溶液を（0.20ml/ウェル）充填した。プレートをガラス製の平底容器（長さ12インチ×幅12インチ×高さ2インチ）に入れ、15分間純粋アルゴン流を吹き付けて酸素を除去した。上記容器は、縦方向に互いに1/4インチ間隔で配列された9個の黒色光蛍光放電灯から垂直方向に1インチ上方に載置した。上記光源（シルバニア社製、F15T8/BLB 蛍光放電灯、18インチ×7/8インチ）は、上記グラフト化容器のガラス製底面において、360nmで40Wh/m<sup>2</sup>のUV照射エネルギーを発する。

光開始によるグラフト化を30分間行なったのち、プレートを96個のウェルが設けられているマイクロ滴定プレートの洗浄装置で2-プロパノールを用いて2回洗浄してベンゾフェノンを除去し、さらに上記洗浄装置で脱イオン水を用いて5回洗浄した。プレートを抗体（タゴ社製、ヤギの抗マウスIgG抗体）で被覆する操作、そして以

下操作であるベンゾフェノンを除去した。そしてプレートを上記洗浄装置で脱イオン水を用いて5回洗浄した。二枚のプレートの洗浄操作に要した時間は5分未満であった。プレートを抗体（タゴ社製、ヤギの抗マウスIgG抗体）で被覆する操作、以下順次、プレートをBSAで不活性化化する操作、標準試料および試料（マウスのIgG）を加える操作、ワサビダイコンのペルオキシダーゼにより標識化された第二抗体を加える操作、基質を加える操作および410nmにおける吸光度の測定は、実施例2において記載した分析方法の操作と同様である。

#### 〔実施例11〕

アクリルアミド（純度は電気泳動に使用する程度）0.38g、N-アクリルオキシスクシンイミド0.25gおよびベンゾフェノン1.25gを1-プロパノール（水分含有量0.2%以下）70.0ml中に、25℃でマグネチック・スターラーを用いて溶解した。上記溶液を焼結ガラス製フィルターで濾過したのち、96個のウェルが

下順次、プレートをBSAで不活性化する操作、標準試料および試料（マウスのIgG）を加える操作、ワサビダイコンのペルオキシダーゼにより標識化された第二抗体を加える操作、基質を加える操作、および410nmにおける吸光度の測定は、実施例2において記載した分析方法の操作と同様である。

#### 〔実施例12〕

アクリルアミド（純度は電気泳動に使用する程度）1.15g、N-アクリルオキシスクシンイミド0.75gおよびベンゾフェノン1.250gを1-プロパノール（水分含有量0.2%以下）210.0ml中に、25℃でマグネチック・スターラーを用いて溶解した。上記溶液を焼結ガラス製フィルターで濾過したのち、96個のウェルが設けられているポリスチレン製プレート（リンプロ社製）六枚に、光開始化合物およびモノマーを含む上記溶液を（0.28ml/ウェル）充填した。プレートを光グラフト化装置内に入れた。プレートのグラフト化操作および洗浄操



FIGURE 2

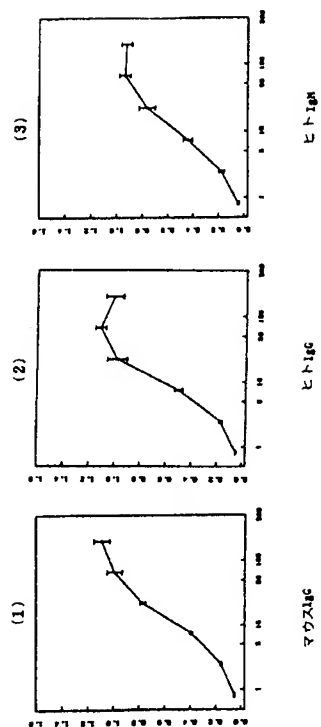
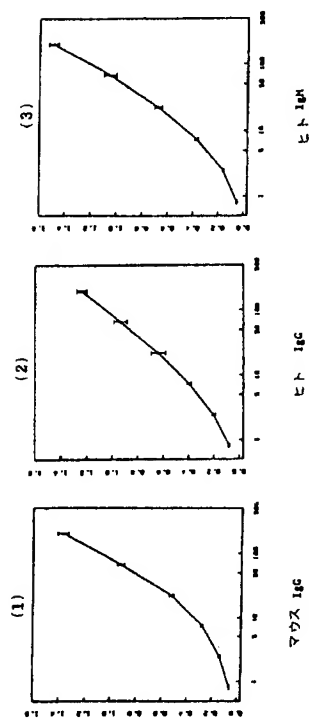


FIGURE 3



第 1 頁の続き

⑤Int.Cl.<sup>4</sup>

C 12 N 11/08

G 01 N 33/543

33/547

// A 61 K 39/00

識別記号

庁内整理番号

7823-4B

A-7906-2G

7906-2G

8214-4C

優先権主張

③1985年4月22日③米国(U S)③725708

手続補正書

昭和60年 6月 6日

特許庁長官 志賀 学 殿

1. 事件の表示

昭和60年 特 許 願 第97675号

2. 発明の名称

アミノ基を有する分子の固定化用物質、  
その製造方法およびその使用方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 エイチ・エス・シー・リサーチ・

ディベロップメント・コーポレーション

住 所 カナダ国、エム・5・ジー、1・エックス・8

オンタリオ・トロント、

ユニバーシティ・アベニュー、555

4. 代理人

住所 東京都新宿区四谷2-14 ミツヤ四谷ビル8階

☎(358)1798/9

氏名 (7467) 弁理士 柳 川 泰 男

5. 補正命令の日付 自発

6. 補正により増加する発明の数 なし

7. 補正の対象 願書の特許出願人の代表者の欄

代理権を証明する書面(委任状)

図面

8. 補正の内容 別紙の通り訂正願書、委任状及びその訳文並びに正式図面を提出する。

方 六  
張 案

